



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 24 796 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 31/505**  
A 61 K 31/28  
A 61 K 9/127

⑳ Aktenzeichen: 197 24 796.2  
㉔ Anmeldetag: 6. 6. 97  
㉕ Offenlegungstag: 10. 12. 98

**DE 197 24 796 A 1**

㉑ **Anmelder:**  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE

㉒ **Vertreter:**  
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125  
Berlin

㉓ **Erfinder:**  
Reszka, Regina, Dr., 16341 Schwanebeck, DE;  
Berger, Gerd, Dr., 10785 Berlin, DE; Pohlen, Uwe,  
10625 Berlin, DE; Jung, Marion, 12055 Berlin, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ⑤④ **Mittel zur Antitumorthherapie**
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein neues Mittel zur Antitumorthherapie auf der Basis von liposomal verkapselten Cytostatika und/oder deren Metaboliten. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.
- Die Erfindung hat das Ziel, ein Drug-Targeting zur Krebsbekämpfung durch geeignete Carriersysteme aufzubauen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Anreicherung von Cytostatika im Tumor und die Verweilzeit im Tumor deutlich zu erhöhen. Gleichzeitig sollen toxische Nebenwirkungen auf die übrigen Organe herabgesetzt werden.
- Das erfindungsgemäße Mittel enthält
- in PEG-, Immuno- oder Immuno/PEG-Liposomen verkapselte Cytostatika und/oder deren Metaboliten,
  - abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Nanopartikel,
  - jod-, gadolinium- oder magnetithaltige Kontrastmittel.
- Ein bevorzugtes Mittel ist durch das Cytostatikum Carboplatin, verkapselt in SUV-PEG, das Stärkepartikel Spherex oder Gelfoam und das Kontrastmittel Gadolinium-DTPA gekennzeichnet.

**DE 197 24 796 A 1**

Es sind mehrere Mittel für die Antitumorthherapie bekannt. In DE 43 41 478 wurde ein Mittel beschrieben, das insbesondere zur Therapie nichtresektabler primärer und sekundärer Lebertumoren verwendet werden kann. Dieses Mittel enthält lyophilisierte Stärkepartikel, die mit einem oder mehreren Cytostatika kombiniert werden und in jod-, gadolinium- oder magnetithaltigen Kontrastmitteln gelöst sind. Ein bevorzugtes Cytostatikum für dieses Mittel ist Carboplatin.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Drug-Targeting zur Krebsbekämpfung durch geeignete Carriersysteme aufzubauen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Anreicherung von Cytostatika im Tumor und die Verweilzeit im Tumor deutlich zu erhöhen. Gleichzeitig sollen toxische Nebenwirkungen auf die übrigen Organe herabgesetzt werden.

Die Verkapselung der Cytostatika erfolgt in an sich bekannter Weise, z. B. durch Herstellung eines Gemischs von Ei-  
phosphatidylcholin, Cholesterol, Dicetylphosphat und zusätzlich Polyethylenglycol in Chloroform und Diisopropylether.

25 a) natürlichen, halbsynthetischen oder vollsynthetischen Amphiphil wie Lipid, Tensid, Emulgator oder Polyethylenglycol (PEG) bzw. Lipid-PEG,  
b) einem Steroid,  
c) einer geladenen Lipidkomponente,  
d) dem wasser- oder lipidlöslichen Cystatikum und  
30 e) einer Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzlichen Hilfsstoffen, z. B. Nanopartikeln besteht.

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_2\text{—O—R}_1 \\
 | \\
 \text{R}_2\text{—O—CH} \quad \text{O} \\
 | \quad \parallel \\
 \text{CH}_2\text{—P—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+\text{—CH}_3 \\
 | \quad | \\
 \text{O—} \quad \text{CH}_3
 \end{array} \quad (I)$$

45

50

55

HO

CH<sub>3</sub>

CH<sub>3</sub>

CH<sub>3</sub>

CH<sub>3</sub>

CH<sub>3</sub>

R

(II)

Chemical structure (II) is a steroid derivative. It features a four-ring steroid nucleus. A hydroxyl group (HO) is attached to the first ring. Methyl groups (CH<sub>3</sub>) are attached to the second, third, and fourth rings. A side chain is attached to the fourth ring, consisting of a methylene group, a quaternary carbon with two methyl groups (CH<sub>3</sub>), and a substituent R.

Die Vorteile des neuen Mittels werden bei der Anwendung sichtbar. Sie liegen in der gegenüber den bekannten Mitteln wesentlich erhöhten Wirksamkeit, was dadurch begründet ist, daß eine größere Menge des Cytostatikums in den Tumor

gebracht werden kann und dort für längere Zeit verweilt. Entscheidend für den therapeutischen Effekt ist der sog. AUC-Wert ("Area under the curve"), die Verweilzeit und die Menge des Therapeutikums, die im Tumor summiert wird. Dieser Wert ist bei Anwendung des erfindungsgemäßen Mittels deutlich höher als bei bekannten Mitteln, u. a. in dem Mittel gemäß DE 43 41 478. Aus **Abb. 12** geht beispielsweise hervor, daß der AUC von verkapseltem 5-Fluoruridin um das 417fache gegenüber der freien Verbindung gesteigert ist (bei Zusatz von abbaubaren Stärkepartikeln um das 4,4fache). 5

Von Bedeutung ist auch das Applikationsregime des erfindungsgemäßen Mittels. Die intraarterielle Applikation ergibt meist eine starke Erhöhung des AUC. Ein weiterer, für die praktische Anwendbarkeit wesentlicher Vorteil besteht darin, daß das Mittel auch oral angewendet werden kann.

Die Erfindung wird durch Ausführungsbeispiele und nachfolgende **Abb. 1** bis 13 näher erläutert. 10

#### Beispiel 1

Männlichen Chinchilla-Kaninchen werden  $1 \times 10^7$  vitale VX2 Tumorzellen in den linken Leberlappen implantiert.

Bei Nachweis einer Tumorgroße von 2 cm erhielten die Tiere nach festgelegtem Schema entweder das erfindungsgemäße Therapeutikum oder ein Gemisch aus gleichen Dosen der handelsüblichen Form entweder als hepatic artery infusion (HAI) über das Portsystem oder intravenös. Dies beinhaltet jeweils 60 mg degradable starch microspheres (Spherex), 50 mg liposomal verkapseltes Carboplatin und 5 ml eines 300 mg/ml jodhaltigen Kontrastmittels (Ultravist 300, Schering). Zu den festgelegten Zeitpunkten (15, 30, 60, 120, 240 min, 8 Std., 12 Std., 24 Std., 48 Std.) wurden die Tiere getötet und die Zytostatikakonzentration im Tumor, Leber, Milz, Niere, Pankreas Magen Lymphknoten analytisch unter Verwendung der Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Die AUC für das liposomale Carboplatin war im Tumor 20fach erhöht. 15 20

#### Beispiel 2

Gleiches Vorgehen wie in Beispiel 1. Es wurden jedoch die in die Leber von WAG/Rij-Ratten implantierten CC 531 Adenocarcinome mit dem erfindungsgemäßen Therapeutikum behandelt. In diesem Modell wurden die Tiere mit 6 mg Spherex, 10 mg liposomalem 5-FU und 0,5 ml Ultravist behandelt. Zu den gleichen Zeitpunkten wie oben beschrieben wurden die Tiere getötet und die 5-FU-Konzentration und dessen Metabolie analytisch unter Verwendung der HPLC bestimmt. Die AUC für das liposomale 5-FU war im Tumor 20fach erhöht. 25

Die Applikation des neu entwickelten Mittels konnte problemlos direkt unter Röntgenkontrolle beobachtet werden, wobei sich die allmähliche Aufsättigung des Tumorgefäßbettes bei stehenden Bildern von der Peripherie bis zum Gefäßstamm über die gesamte Phase der Embolisation dargestellt und während der gesamten Dauer des Gefäßverschlusses als stehendes Bild nachvollziehbar war. Ebenso konnte die einsetzende Reperfusion dokumentiert werden. 30

#### Abbildungen

##### 1. Ergebnisse mit Carboplatin als Cytostatikum, Verkapselung in SUV-PEG und Spherex bzw. Gelfoam als Stärkepartikel 35

**Abb. 1** Vergleich des Tumorwachstums 40

**Abb. 2-4** Pharmakokinetik in Tumor und Leber

**Abb. 5** Organkonzentration

**Abb. 6-7** Vergleich der Flächen unter der Kurve Carboplatin/liposomal verkapseltes Carboplatin

**Abb. 8** Tierexperimentelle Studie 45

##### 2. Ergebnisse mit Fluoruracil

**Abb. 9** Konzentration in Tumor und Leber

**Abb. 10-12** Pharmakokinetik und Konzentrationen bei unterschiedlichen Applikationsformen

**Abb. 13** Applikation mit und ohne Spherex 50

#### Patentansprüche

1. Mittel zur Antitumorthérapie auf der Basis von liposomal verkapselten Cytostatika und/oder deren Metaboliten, enthaltend 55

- in PEG-, Immuno- oder Immuno/PEG-Liposomen verkapselte Cytostatika und/oder deren Metaboliten,
- abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Nanopartikel
- jod-, gadolinium- oder magnetithaltige Kontrastmittel.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verkapselung der Cytostatika und/oder deren Metaboliten in 60

- SUV(Small unilamellar vesicles)-PEG
- LUV(Large unilamellar vesicles)-PEG
- REV(Reversed face evaporation vesicles)-PEG
- MLV(Multilamellar vesicles)-PEG erfolgt.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verkapselung der Cytostatika und/oder deren Metaboliten in 65

- Anti-Ki-67-Immun-PEG-Liposomen erfolgt.

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verkapselung der Cytostatika und/oder deren Metabo-

liten in

– Anti-CEA-PEG-Liposomen erfolgt.

5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Stärkepartikel eine Korngröße von 60–90 nm aufweisen.

5 6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß absorbierbare Gelatinepulver eingesetzt werden.

7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nanopartikel eine 25%ige wäßrige Lösung von Poloxamer eingesetzt wird.

8. Mittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Bestandteile

– als Cytostatikum 5-Fluoruracil,

10 – Verkapselung in SUV-PEG,

– als Stärkepartikel Spherex,

– als Kontrastmittel Gadolinium-DTPA.

9. Mittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Bestandteile

– als Cytostatikum 5-Fluoruridin,

15 – Verkapselung in SUV-PEG,

– als Stärkepartikel Spherex,

– als Kontrastmittel Gadolinium-DTPA.

10. Mittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Bestandteile

– als Cytostatikum Carboplatin,

20 – Verkapselung in SUV-PEG,

– als Stärkepartikel Spherex oder Gelfoam,

– als Kontrastmittel Gadolinium-DTPA.

11. Mittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Bestandteile

– als Cytostatikum 5-Fluoruridin-5'-hexadecylphosphat,

25 – Verkapselung in SUV-PEG,

– als Stärkepartikel Spherex oder Gelfoam,

– als Kontrastmittel Gadolinium-DTPA.

12. Verwendung des Mittels nach den Ansprüchen 1 bis 6 durch intraarterielle, intravenöse oder orale Applikation.

30

---

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen

---

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

# Ergebnisse

<u>Behandlungsform</u>	<u>Tumorstadium um den Faktor</u> (7 Tage nach Behandlung)	<u>Kontrastmittelan- flutung in der Leber</u>
Kontrolle	3.65 ± 2.45	unverändert
Spherex	2.38 ± 1.35	▼ 6%
Gelfoam	3.93 ± 1.66	unverändert
Carboplatin	1.45 ± 0.96	▼ 7%
Carboplatin/Spherex	1.15 ± 0.24	▼ 19%
Carboplatin/Gelfoam	0.85 ± 0.08	▼ 11%

Abb. 1

Pharmakokinetik von Carboplatin in der lokoregionären Anwendung

50 mg Carboplatin+60mg DSM versus 50 mg SUV-PEG  
Carboplatin+DSM

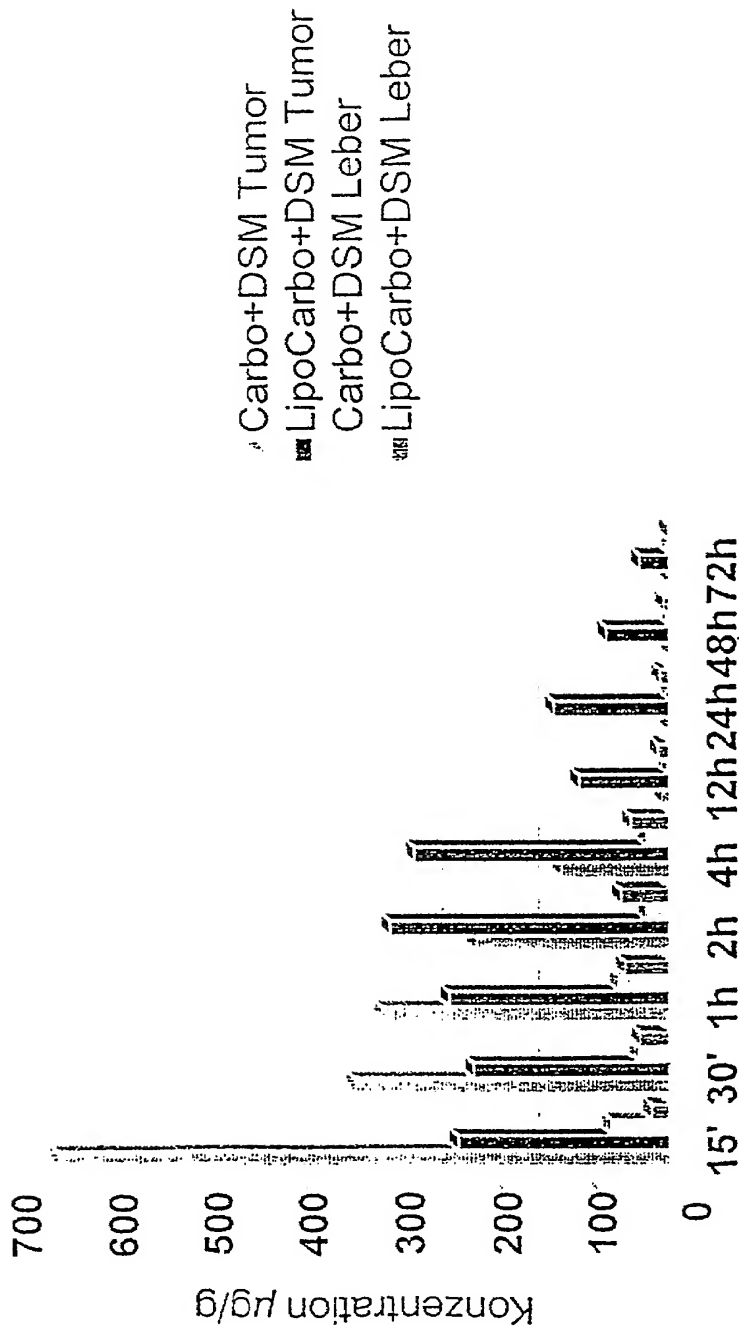


Abb. 2

SUV-PEG Carboplatin Liposomen

Konzentration Leber/Tumor

i.a. lokoregionär + DSM

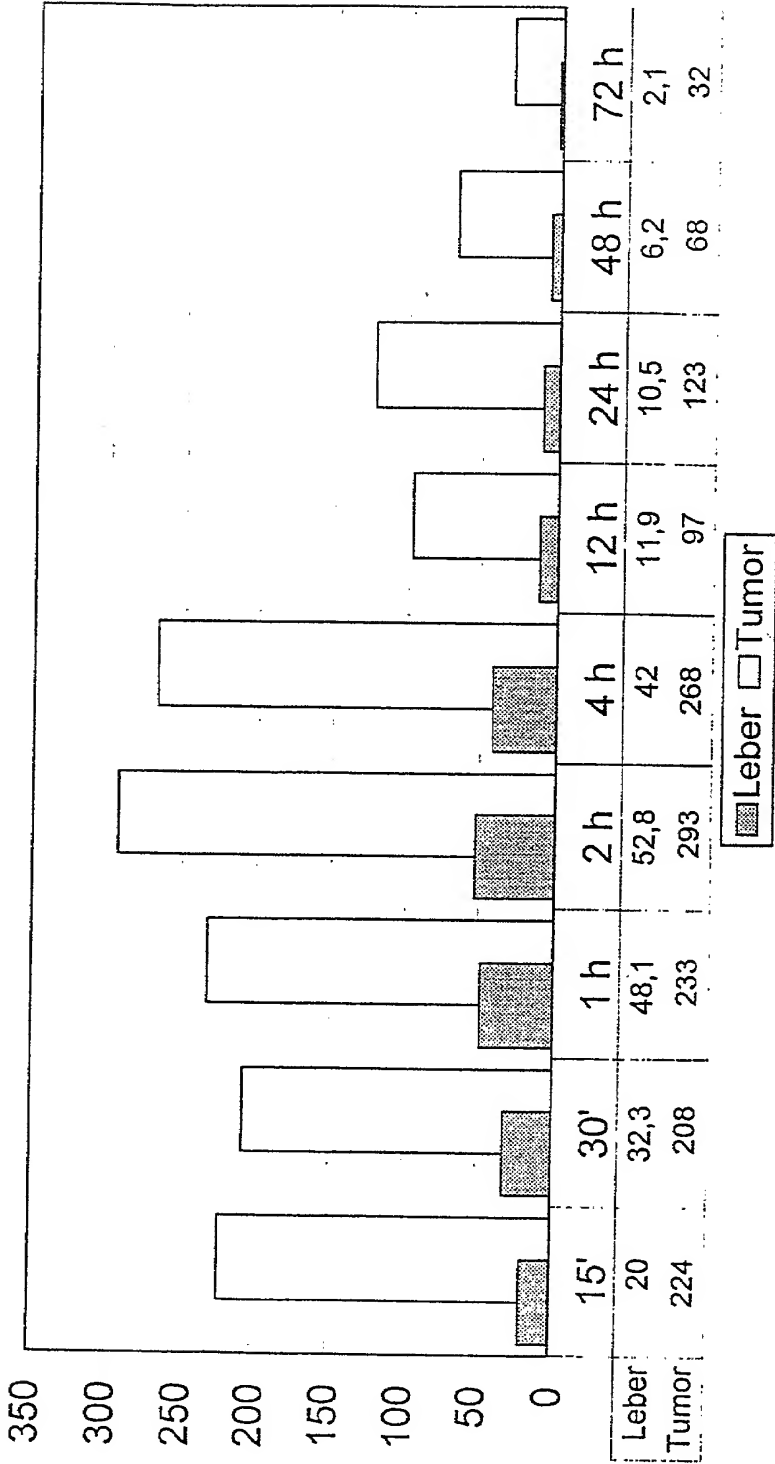


Abb. 3



# SUV-PEG Carboplatin Liposomen

## Konzentration Tumor/Leber

i.a. lokoregionär + DSM (50 mg)

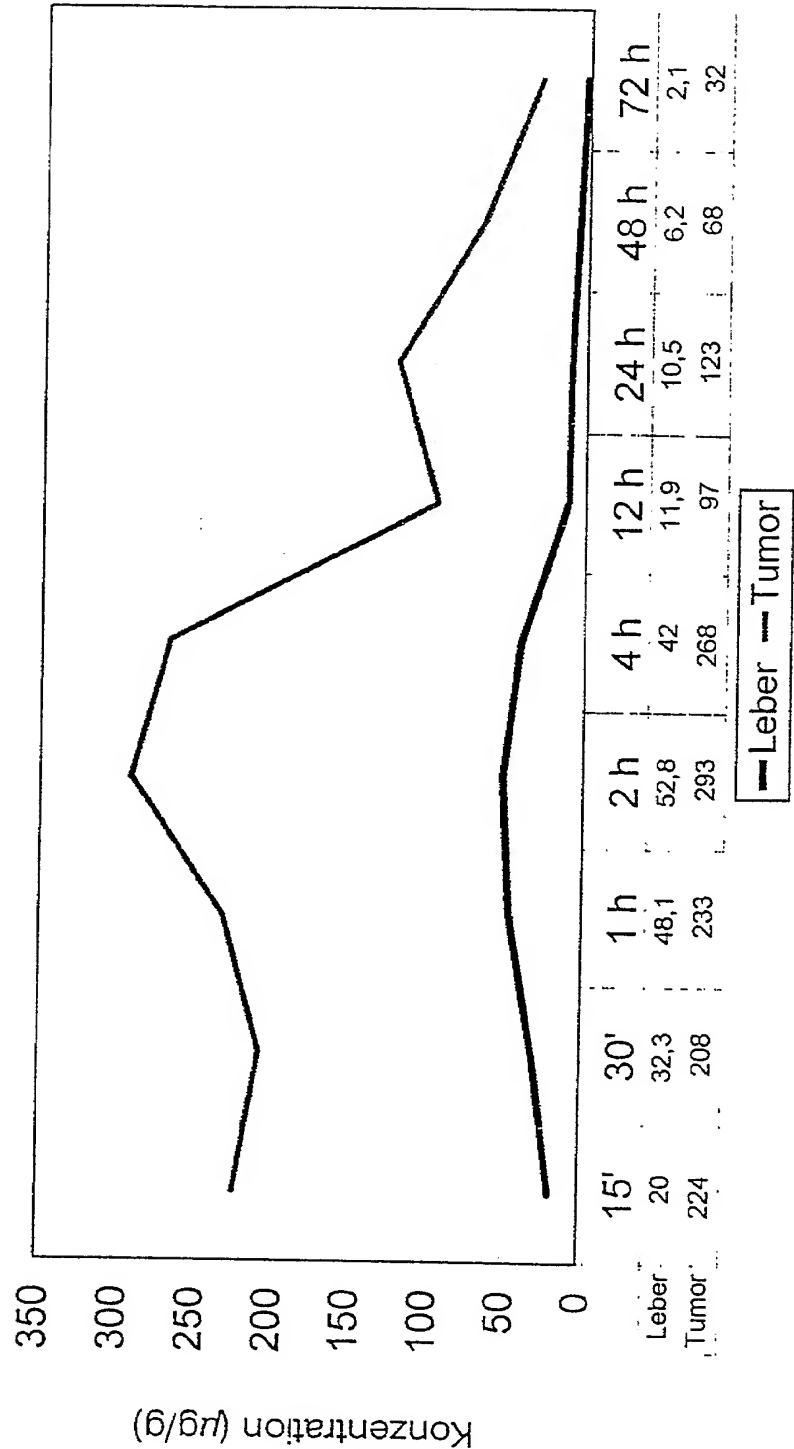


Abb. 4

# SUV-PEG Carboplatin Liposomen

## Organkonzentrationen

i.a. lokoregionär + DSM (50 mg)

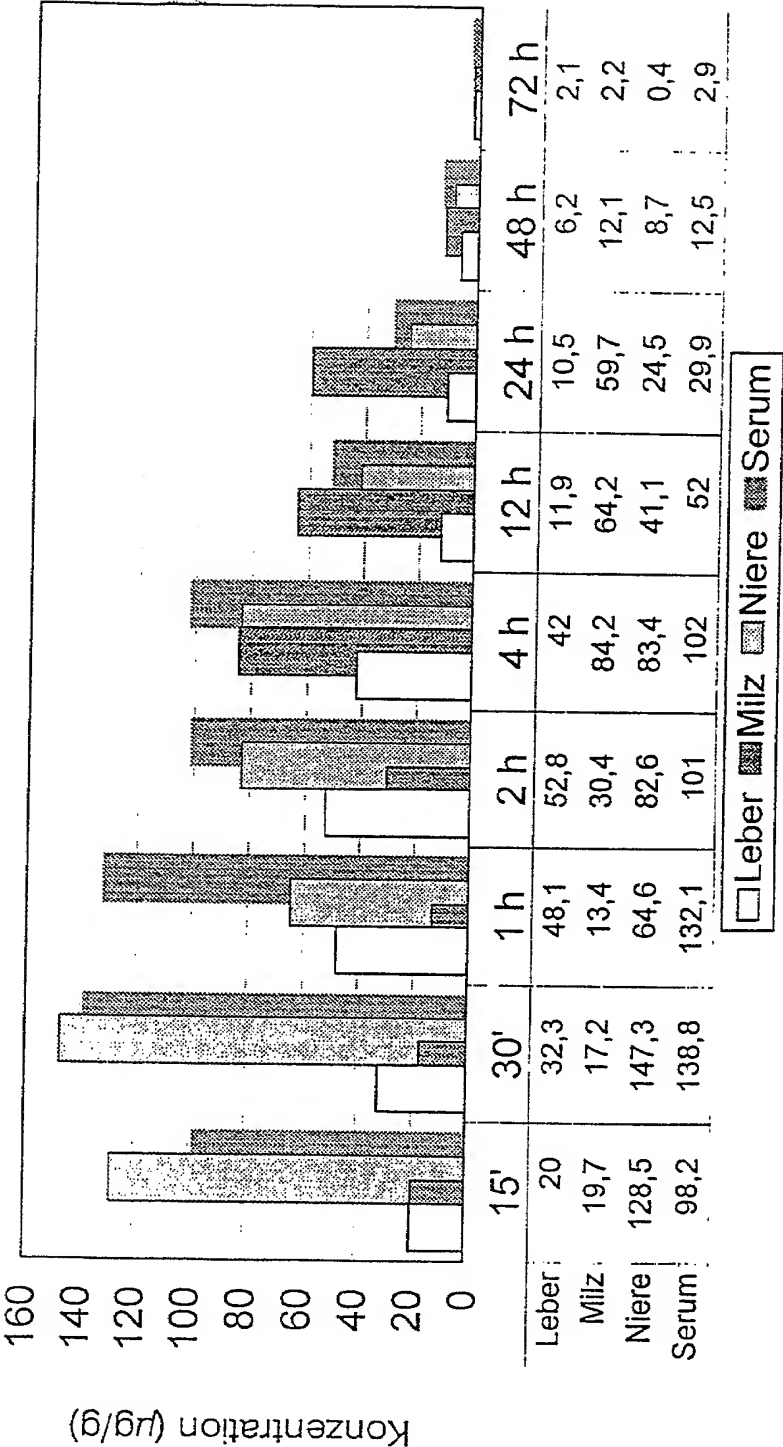


Abb. 5

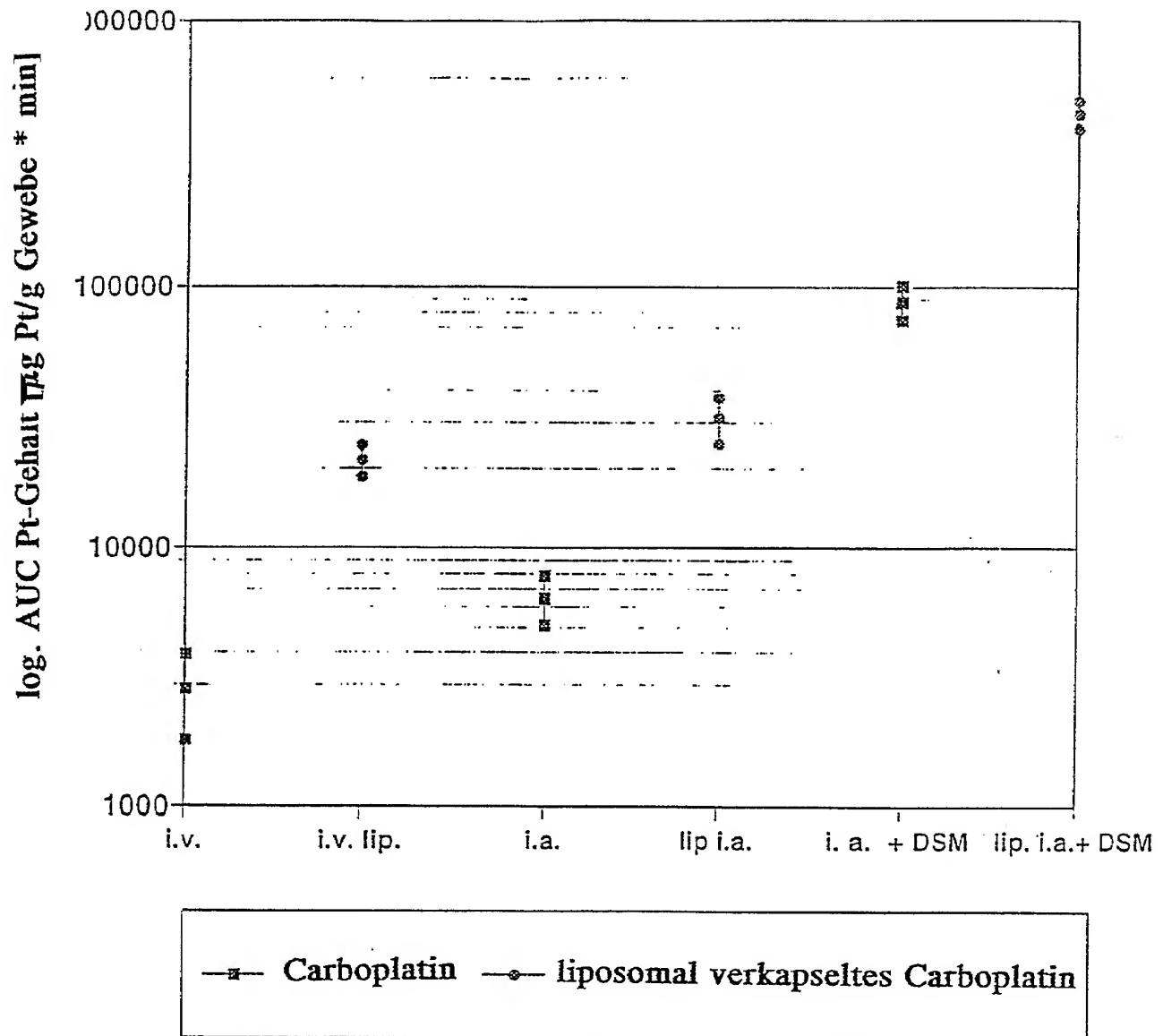
**Pt-Gehalt des VX-2 Tumors****Fläche unter der Kurve (Mittel und 99% Konfidenz-Intervall)**

Abb. 6

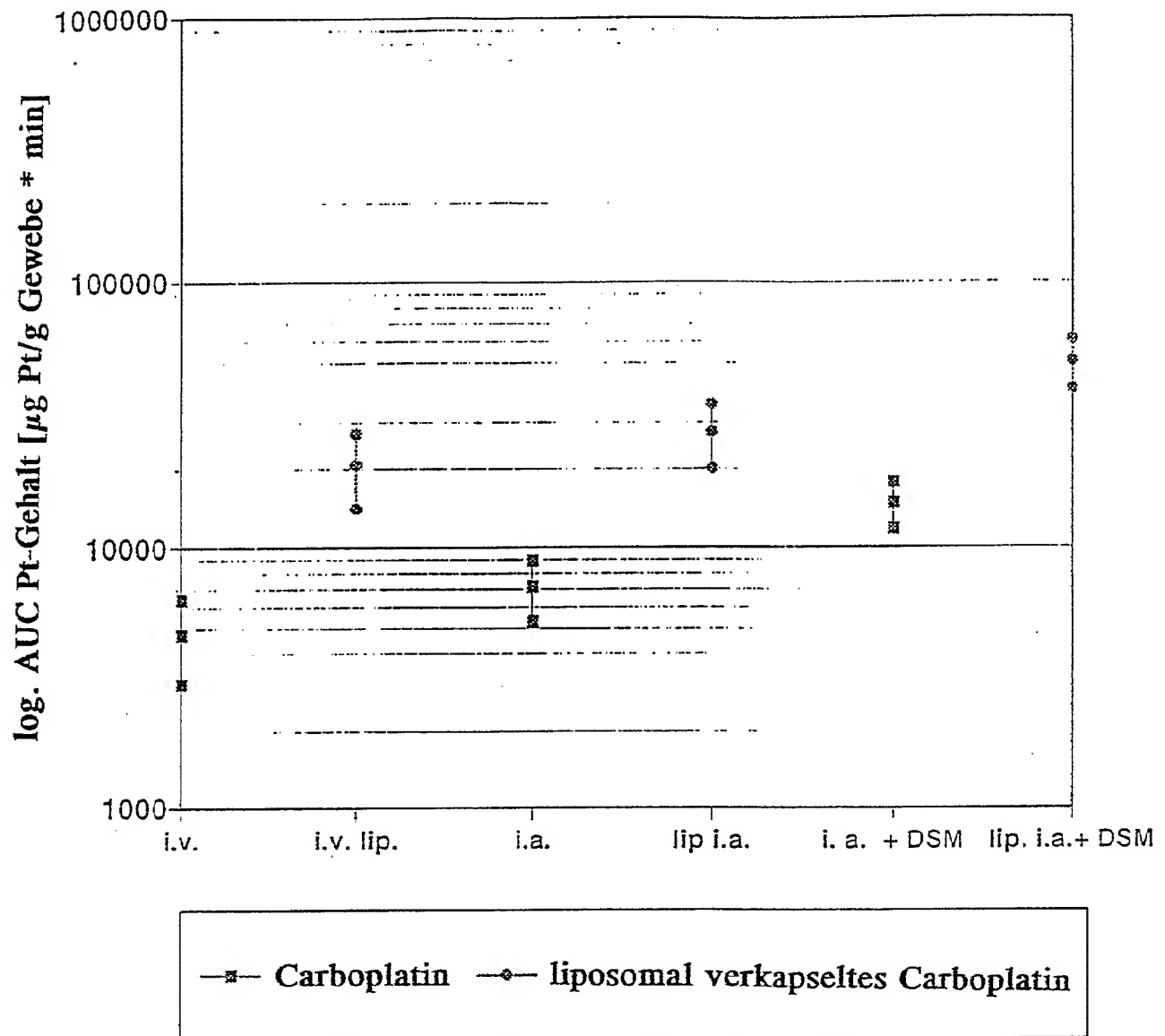
**Pt-Gehalt der Leber****Fläche unter der Kurve (Mittel und 99% Konfidenz-Intervall)**

Abb. 7

# Konzentrationsverlauf nach lokoregionärer Applikation von 50 mg Carboplatin im Tumor- / Lebergewebe

Tierexperimentelle Studie am VX-2-Lebertumor des Kaninchens:  
ohne Embolisat / mit 60 mg Spherex / mit 10 mg Gelfoam

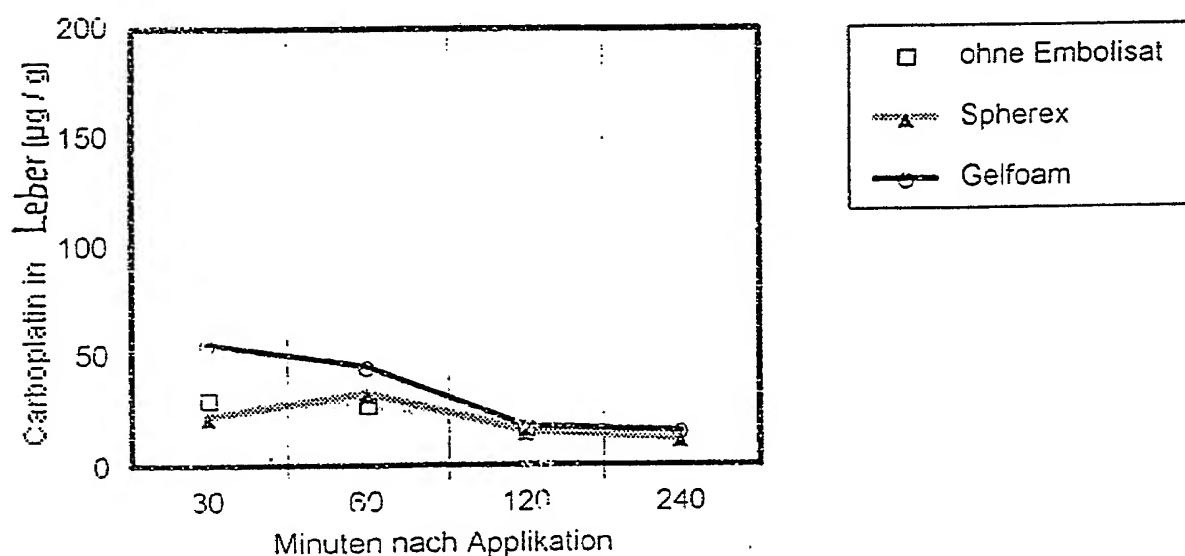
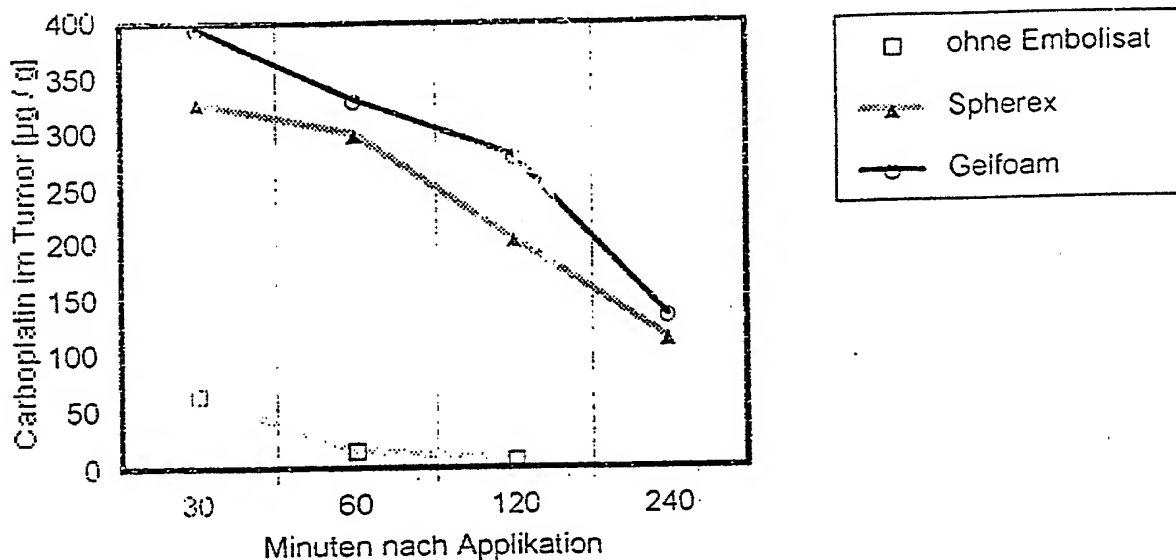


Abb. 8

Vergleich von Leber- und Tumorkonzentration von 5-FU bzw. 5-FU-PEG bei unterschiedlicher Applikationsform

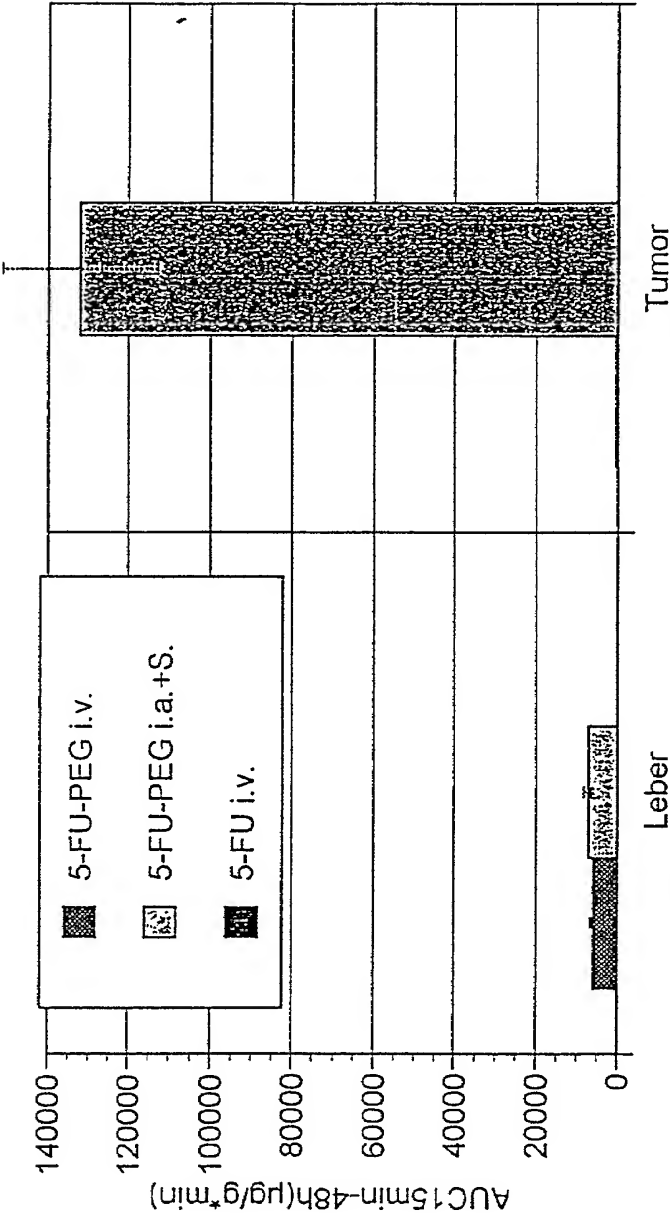


Abb. 9

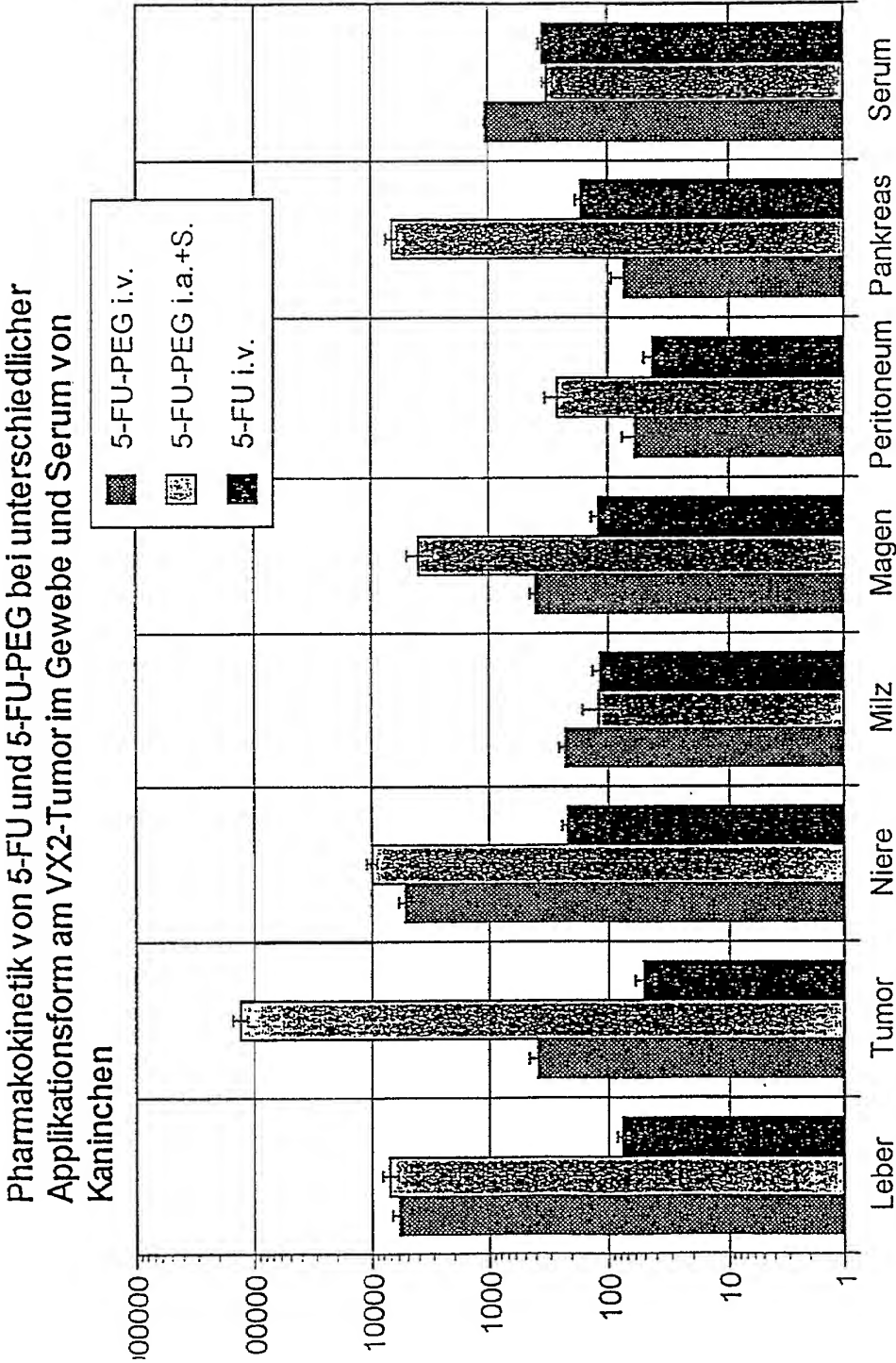


Abb. 10

Vergleich der Leber- und Tumorkonzentrationen von 5-FU bzw. 5-FU-PEG nach unterschiedlicher Applikationsform

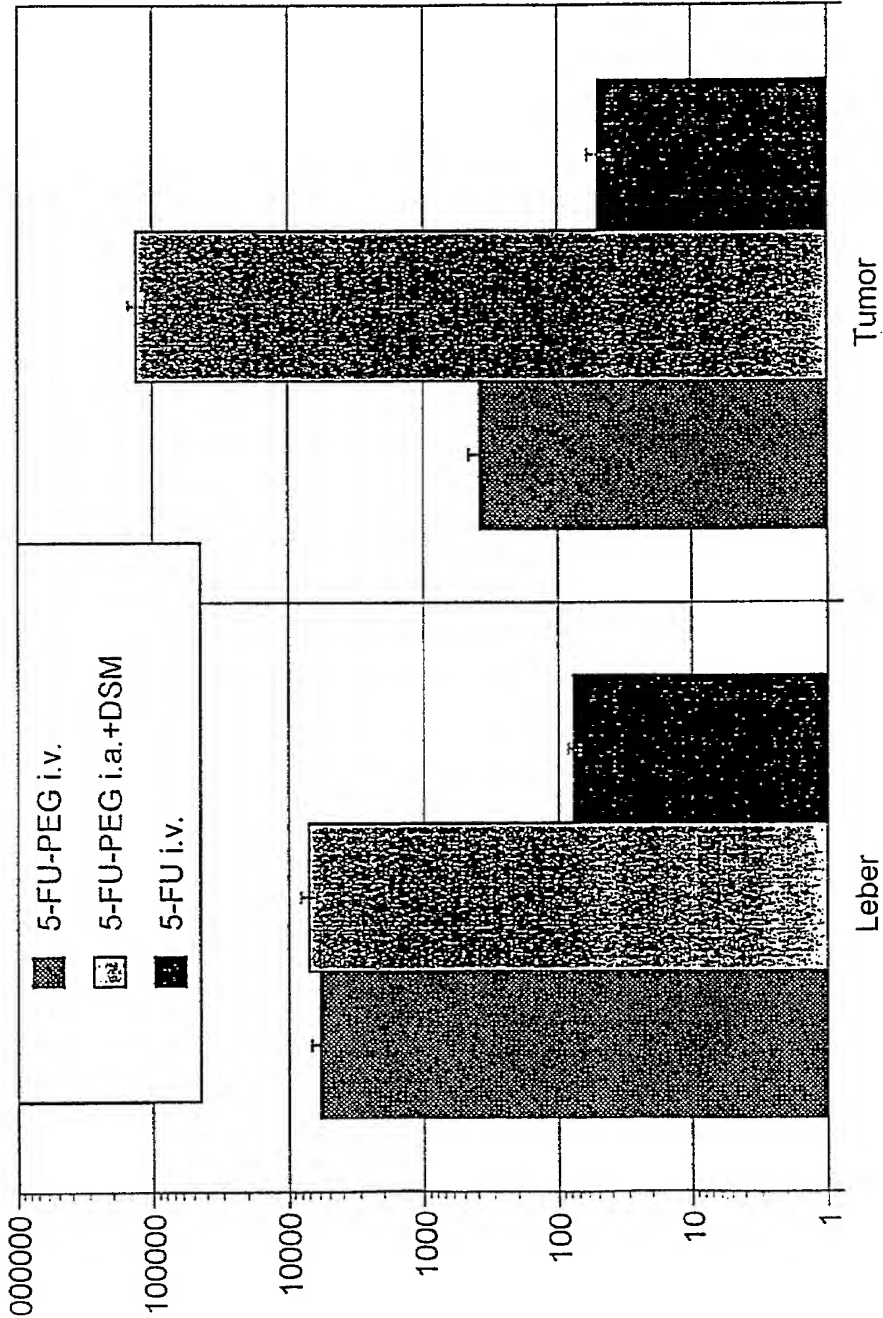


Abb. 11



AUC15min-72h von 5-FU im Tumor beim CC531-Adenokarzinom in der WAG/RJ-  
Ratte nach unterschiedlicher Applikationsform

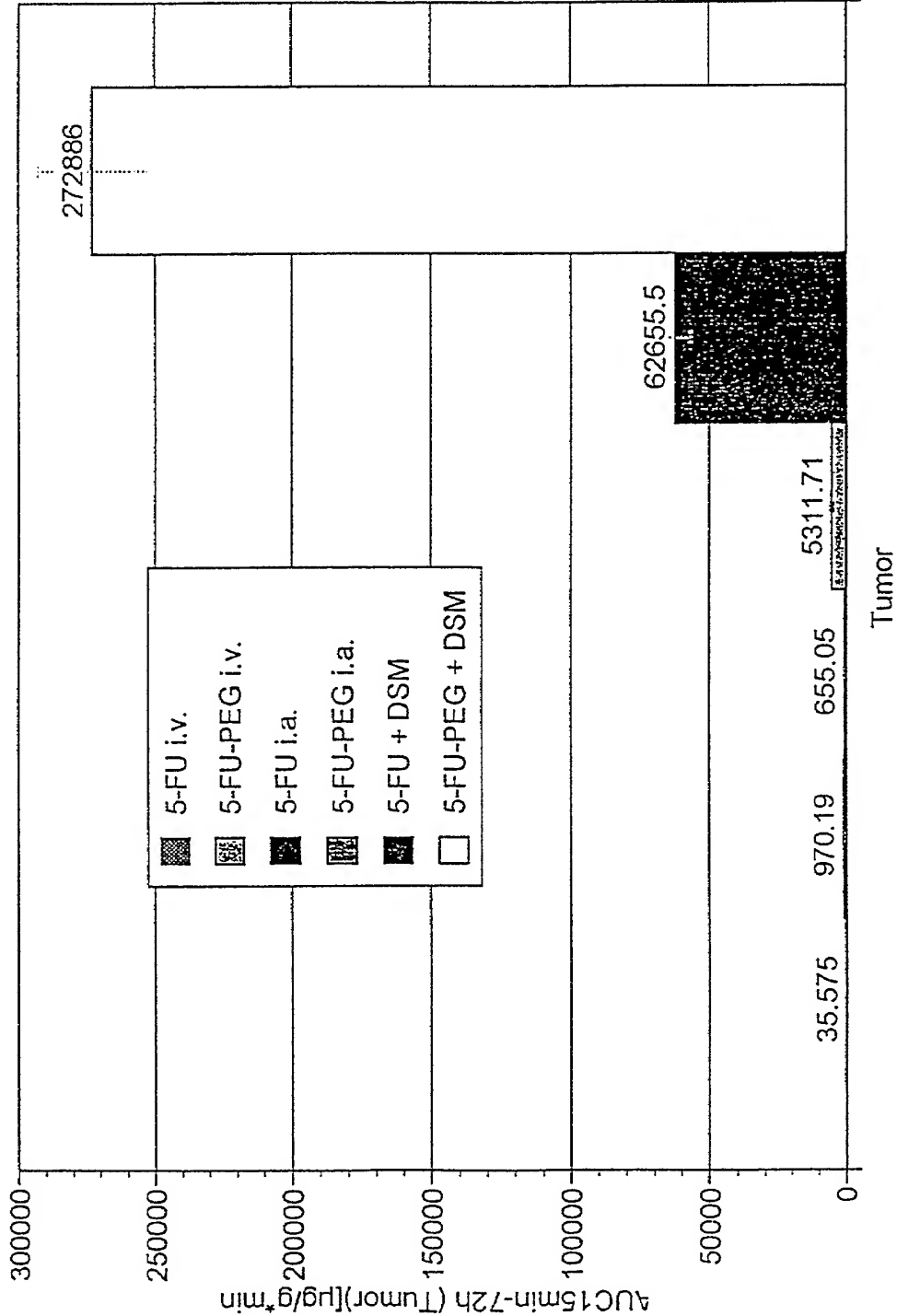


Abb. 12

5-FU-PEG i.v. mit u. ohne Spherex

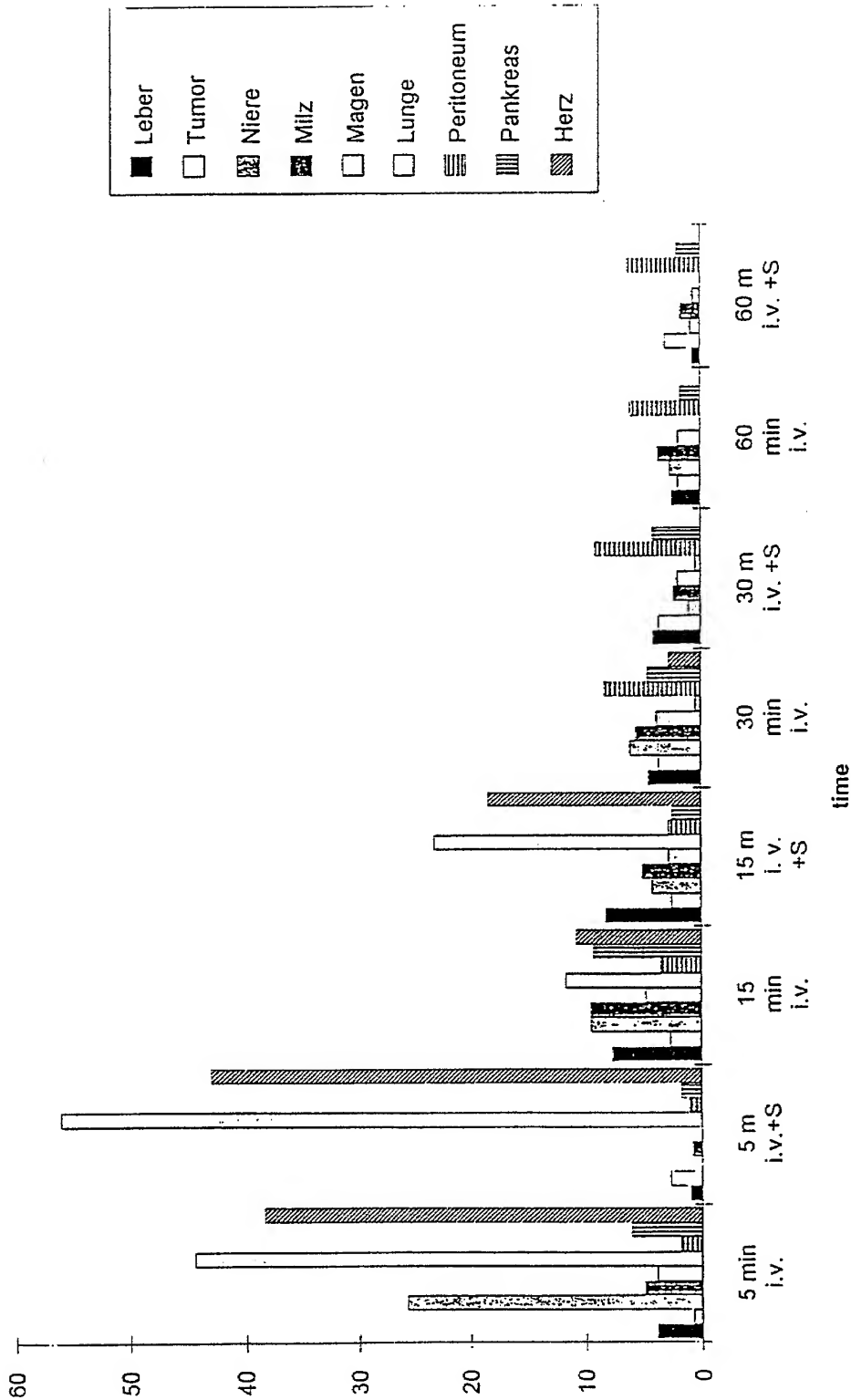


Abb. 13